

METHOD OF DETECTION/DETERMINATION FOR EUBACTERIA

Publication number: JP2002051783

Publication date: 2002-02-19

Inventor: FUKUDA HIROAKI; OKAMOTO YASUSHI

Applicant: DENSO CORP

Classification:

- international: G01N33/53; C12N15/09; C12Q1/68; G01N21/78;
G01N33/566; G01N33/569; G01N33/58; G01N33/53;
C12N15/09; C12Q1/68; G01N21/77; G01N33/566;
G01N33/569; G01N33/58; (IPC1-7): C12N15/09;
C12Q1/68; G01N21/78; G01N33/53; G01N33/566;
G01N33/569; G01N33/58

- european:

Application number: JP20000241500 20000809

Priority number(s): JP20000241500 20000809

Report a data error here

Abstract of JP2002051783

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for rapidly detecting/determining all the microbial species belonging to eubacteria. **SOLUTION:** This method is a method for detecting/determining only specific species in various eubacteria groups and includes the following steps: (1) a polymerase chain reaction which uses a probe obtained by adding a fluorescent pigment to an oligonucleotide containing the sequence of 104th to 126th from the sense side of a DNA sequence encoding 16S rRNA in eubacteria on the numbering of the DNA sequence encoding 16S rRNA in Escherichia coli or its complementary sequence and a primer designed on the basis of a variation domain sequence present in the upstream and downstream sides of the above probe; and (2) a measurement for fluorescence intensity on the fluorescence wavelength of the changed probe.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-51783
(P2002-51783A)

(43) 公開日 平成14年2月19日 (2002.2.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	データベース [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 j
C 1 2 Q 1/68		C 0 1 N 21/78	C 2 G 0 5 4
G 0 1 N 21/78		33/53	M 4 B 0 2 4
33/53		33/566	4 B 0 6 3
33/566		33/569	F
審査請求 未請求 請求項の数25 O L (全 14 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-241500 (P2000-241500)	(71) 出願人	000004260 株式会社デンソー 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地
(22) 出願日	平成12年8月9日 (2000.8.9)	(72) 発明者	福田 裕章 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式会 社デンソー内
		(72) 発明者	岡本 泰志 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式会 社デンソー内
		(74) 代理人	10007/517 弁理士 石田 敬 (外3名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 真正細菌の検出・定量法

(57) 【要約】

【課題】 真正細菌に属する全ての菌種を迅速に検出・定量する方法の提供。

【解決手段】 各種真正細菌群の中の特異的な種のみを検出・定量する方法であって、以下のステップ：(1) 大腸菌 (*Escherichia coli*) の16S rRNAをコードするDNA配列のナンバリングにおいて、真正細菌の16S rRNAをコードするDNA配列のセンス側から数えて104番目から126番目の配列又はその相補的配列を含むオリゴヌクレオチドに蛍光色素を付加したプローブと、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーを用いたポリメラーゼチェーンリアクション；及び(2) 変化したプローブの蛍光波長における蛍光強度の測定；を含む前記方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 各種真正細菌群の中の特異的な種のみを検出・定量する方法であって、以下のステップ：(1) 大腸菌 (*Escherichia coli*) の16S rRNAをコードするDNA配列のナンバリングにおいて、真正細菌の16S rRNAをコードするDNAのセンス側から数えて104番目から126番目の配列又はその相補的配列を含むオリゴヌクレオチドに蛍光色素を付加したプローブと、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーとを用いたポリメラーゼチェーンリアクション；及び(2) 変化したプローブの蛍光波長における蛍光強度の測定；を含む前記方法。

【請求項2】 前記の特異的な種が、バチルス (*Bacillus*) 属、スタフィロкокカス (*Staphylococcus*) 属及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号1に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 配列番号1に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項4】 請求項2に記載の方法に用いられる、請求項3に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

【請求項5】 前記の特異的な種が、ブレヴィバチルス (*Brevibacillus*) 属、パエニバチルス (*Paenibacillus*) 属及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号2に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 配列番号2に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項7】 請求項5に記載の方法に用いられる、請求項6に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

【請求項8】 前記の特異的な種が、アクチノバチルス (*Actinobacillus*) 属及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号3に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 配列番号3に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項10】 請求項8に記載の方法に用いられる、請求項9に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

【請求項11】 前記の特異的な種が、ミコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アクチノマイセス (*Actinomyces*)、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号4に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 配列番号4に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項13】 請求項11に記載の方法に用いられる、請求項12に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

【請求項14】 前記の特異的な種が、レジオネラ (*Legionella*) 属及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号5に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項15】 配列番号5に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項16】 請求項14に記載の方法に用いられる、請求項15に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

【請求項17】 前記の特異的な種が、敗血症の原因菌である、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、スタフィロкокカス (*Staphylococcus*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属の細菌及び大腸菌 (*Escherichia coli*) 並びにその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号6に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項18】 配列番号6に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項19】 請求項17に記載の方法に用いられる、請求項18に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

【請求項20】 前記の特異的な種が、アセトバクター (*Acetobacter*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、ブラデヒドビウム (*Bradyrhizobium*) 属、カウロバクター (*Caulobacter*) 属、グルコノバクター (*Gluconobacter*) 属、パラコッカス (*Paracoccus*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属などの紅色非硫黄細菌 (*Proteobacteria*) の α グループに属する細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号7に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項21】 配列番号7に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項22】 請求項20に記載の方法に用いられる、請求項21に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

【請求項23】 前記の特異的な種が、アルカリジーン (*Alcaligenes*) 属、ボルデトラ (*Bordetella*) 属、スファエロチルス (*Sphaerotilus*) 属、スピリラム (*Spirillum*) 属などの紅色非硫黄細菌 (*Proteobacteria*) の β グループに属する細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号8に記載の配列を含む、請

求項1に記載の方法。

【請求項24】 配列番号8に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項25】 請求項23に記載の方法に用いられる、請求項23に記載のオリゴヌクレオチドを含むアロブ試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本願発明は、ポリメラーゼチェーンリアクション（以下、PCRと略す）による各種真正細菌を検出・定量する方法、及び当該方法に用いるアロブに関する。各種の微生物の検出・定量は、医学の領域をはじめ他の分野において行なわれている。結核や敗血症などの感染症を引き起こす細菌の検出・定量は特に重要である。本発明は、感染症を引き起こす細菌類を含む各種真正細菌の検出・定量のためのアロブ、及び当該アロブを用いた検出・定量方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】細菌類の検出・同定には、一般に、選択培地による分離や増殖培地による増殖、顕微鏡観察や免疫学的な反応性を利用した方法など様々なものが用いられている。これらの検出・同定方法の操作は多大な時間と熟練を必要とする。化学的な性状をもとに菌種を特定するキットの開発により熟練の必要性は低下したが、培養に時間を要する問題は未だ解決されていない。

【0003】近年、各種細菌の遺伝子を標的として当該菌を検出・同定する技術が開発された。かかる技術により、菌の検出・同定において大幅な時間短縮が可能となっている。このような遺伝子の例は、特許第2552787号や特公平5-78319号、特開平8-297号、特開平10-191982中に記載されている16Sリボソーム遺伝子（以下、16SrRNA配列と略す）や、特許第2540023号中に記載されている、菌に特異的な熱ショック蛋白質である。

【0004】特許第2540023号は、マイコバクテリウム属を検出するプライマーを提供しているが、その種類も多く、また定量解析ができない。特許第2552787号では、マイコバクテリウム属細菌に特異的なプライマーを用いて増幅断片を調製し、制限酵素処理と、アロブのハイブリダイズとの併用により結核菌群のみを検出する方法である。この方法は、結核菌群の検出を可能にするが、定量性がなく、不十分な情報しか提供できない。特開平10-191982号は、レジオネラ菌に特異的なアロブ（塩基配列871-890、大腸菌16SrRNA配列のナンバリング）により、レジオネラ菌を検出する方法を開示している。この方法ではレジオネラ菌をハイブリダイゼーションにより検出することができるが、バックグラウンドの影響を受けやすいため感度が低い。特開平8-297号は、真正細菌に特徴的な

核酸標的配列をPCRや鎖置換増幅（SDA）で検出するためのオリゴヌクレオチドプライマーを開示しているが、この方法では、種特異的な検出をおこなうことはできない。以上のように、特定の菌や真正細菌などを検出する様々な技術が確立されてきているものの、これらの技術のいずれも、特定の菌を迅速に定量することはできない。さらに、特定の菌を定量する際に、菌特異的なアロブを用いることもあるが、このような菌特異的なアロブは、その特異性の故に汎用性がないため、多種の菌を定量するためには多種のアロブが必要になるという問題がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本願発明の課題は、真正細菌に属する全ての菌種を迅速に検出・定量する技術を確立することであり、特に、それに基づき菌種特異的なプライマーを設計することができる変動領域に挟まれた、菌種間で比較的保存性の高い領域内で、当該菌種間で汎用性の高いアロブを設計することである。そして、菌種毎に特異的なプライマーと本願発明に係る汎用性の高いアロブを用いて定量的PCRをおこなうことにより特定の菌の検出・定量を迅速におこなうことも、本発明の課題である。

【0006】

【課題を解決するための手段】本願発明は、各種真正細菌群の中の特異的な種のみを検出・定量する方法であって、以下のステップ：（1）大腸菌（*Escherichia coli*）の16SrRNAをコードするDNA配列のナンバリングにおいて、真正細菌の16SrRNAをコードするDNA配列のセンス側から数えて104番目から126番目の配列又はその相補的配列を含むオリゴヌクレオチドに蛍光色素を付加したアロブと、上記アロブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーとを用いたポリメラーゼチェーンリアクション；及び（2）変化したアロブの蛍光波長における蛍光強度の測定；を含む前記方法を提供する。

【0007】本願発明の1の態様においては、前記の特異的な種が、バチルス（*Bacillus*）属、スタフィロコッカス（*Staphylococcus*）属、及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号1に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号1に記載のオリゴヌクレオチド、及び前記方法に用いられる、前記オリゴヌクレオチドを含むアロブ試薬も提供される。

【0008】配列番号1に示す配列を含むアロブは、バチルス属やスタフィロコッカス属の細菌の16SrRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記アロブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したアロブの蛍光波長において蛍光強度を測定すること

により、バチルス属およびスタフィロコッカス属の全菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：バチルス・アルカロフィラス (*Bacillus alcalophilus*)、バチルス・アミロリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・バジウス (*Bacillus badius*)、バチルス・カルドリティカス (*Bacillus caldolyticus*)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、バチルス・コーニイ (*Bacillus cohnii*)、バチルス・ファーマス (*Bacillus firmus*)、バチルス・インソリタス (*Bacillus insolitus*)、バチルス・カウストフィラス (*Bacillus kaustophilus*)、バチルス・レントス (*Bacillus lentus*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、

【0009】バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バチルス・メチノリカス (*Bacillus methenolicus*)、バチルス・パリダス (*Bacillus pallidus*)、バチルス・ポピリエ (*Bacillus popilliae*)、バチルス・プミラス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・スミチイ (*Bacillus smithii*)、バチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・サーモアミロボランス (*Bacillus thermoamylovorans*)、バチルス・サーモデントリフィカンス (*Bacillus thermodenitrificans*)、バチルス・サーモグルコシダシウス (*Bacillus thermoglucosidasius*)、バチルス・サーモレオボランス (*Bacillus thermoleovorans*)、バチルス・ベデリ (*Bacillus vedderi*)、カロラマター・ファービダス (*Caloramator fervidus*)、

【0010】クロストリジウム・ファービダス (*Clostridium fervidus*)、クルシア・ギブソニイ (*Kurthia gibsonii*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、サッカロコッカス・サーモフィラス (*Saccharococcus thermophilus*)、サルシナ・ベントリキュリ (*Sarcina ventriculi*)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、スタフィロコッカス・エピダーミディス (*Staphylococcus epidermidis*)、及びスタフィロコッカス・ホミニス (*Staphylococcus hominis*)。

【0011】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、ブレビバチルス (*Brevibacillus*) 属、パエニバチルス (*Paenibacillus*) 属、及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号2に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号2に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0012】配列番号2に示す配列を含むプローブは、ブレビバチルス属やパエニバチルス属などの細菌の16SrRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列

に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することにより、ブレビバチルス属やパエニバチルス属の全菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：ブレビバチルス・アグリ (*Brevibacillus agri*)、ブレビバチルス・ボルステレンシス (*Brevibacillus borstelensis*)、ブレビバチルス・ブレビス (*Brevibacillus brevis*)、ブレビバチルス・セントロスボラス (*Brevibacillus centrosporus*)、ブレビバチルス・コシネンシス (*Brevibacillus choshinensis*)、ブレビバチルス・フォルモサス (*Brevibacillus formosus*)、ブレビバチルス・ラチロスボラス (*Brevibacillus laterosporus*)、ブレビバチルス・パラブレビス (*Brevibacillus parabrevis*)、

【0013】ブレビバチルス・レウスゼリ (*Brevibacillus reuszeri*)、ブレビバチルス・サーモルバー (*Brevibacillus thermoruber*)、パエニバチルス・アヒベンシス (*Paenibacillus ahibensis*)、パエニバチルス・アルベイ (*Paenibacillus alvei*)、パエニバチルス・アミロリティカス (*Paenibacillus amylolyticus*)、パエニバチルス・アピアリウス (*Paenibacillus apiarius*)、パエニバチルス・アゾトフィクサンス (*Paenibacillus azotofixans*)、パエニバチルス・コンドロイチナス (*Paenibacillus chondroitinus*)、パエニバチルス・カードラノリティカス (*Paenibacillus curdolanolyticus*)、パエニバチルス・デエラム (*Paenibacillus durum*)、パエニバチルス・グルカノリティカス (*Paenibacillus glucanolyticus*)、パエニバチルス・イリノイセンシス (*Paenibacillus illinoisensis*)、パエニバチルス・コベンシス (*Paenibacillus kobensis*)、パエニバチルス・ラルバエ (*Paenibacillus larvae*)、パエニバチルス・マセランス (*Paenibacillus macerans*)、パエニバチルス・マクアリエンシス (*Paenibacillus macquariensis*)、パエニバチルス・パブリ (*Paenibacillus pabuli*)、パエニバチルス・ペオリエ (*Paenibacillus peoriae*)、パエニバチルス・ポリミクサ (*Paenibacillus polymyxa*)、パエニバチルス・チアミノリティカス (*Paenibacillus thiaminolyticus*)、及びパエニバチルス・バリダス (*Paenibacillus validus*)。

【0014】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、アクチノバチルス (*Actinobacillus*) 属、及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号3に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号3に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0015】配列番号3に示す配列を含むプローブは、アクチノバチルス属などの細菌の16SrRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計した

プライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することにより、アクチノバチルス属の全菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：アクチノバチルス・カプスラタス (*Actinobacillus capsulatus*)、アクチノバチルス・エクーリ (*Actinobacillus equuli*)、アクチノバチルス・ホミニス (*Actinobacillus hominis*)、アクチノバチルス・インドリカス (*Actinobacillus indolicus*)、アクチノバチルス・リグニエシイ (*Actinobacillus lignieresii*)、及びアクチノバチルス・プレウロニューモニエ (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)。

【0016】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、ミコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アクチノマイセス (*Actinomyces*)、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)、ロドコッカス (*Rhodococcus*)、及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号4に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号4に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる、前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0017】配列番号4に示す配列を含むプローブは、ミコバクテリウム属およびコリネバクテリウム属およびアクチノマイセス属およびストレプトマイセス属およびロドコッカス属などの放線菌およびその類縁の細菌の16SrRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することで、放線菌およびその類縁の細菌の全菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、ストレプトマイセス・サルモニス (*Streptomyces salmonis*)、アクチノマイセス・デンティコレンス (*Actinomyces denticolens*)、アクチノマイセス・オドントリチカス (*Actinomyces odontolyticus*)、アクチノマイセス・ピオゲネス (*Actinomyces pyogenes*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ロイコノストック・ラクティス (*Leuconostoc lactis*)、コリネバクテリウム・ジフテリエ (*Corynebacterium diphtheriae*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・ボビス (*Corynebacterium bovis*)、コリネバクテリウム・クッシェリ (*Corynebacterium kutscheri*)、

【0018】コリネバクテリウム・シュードチューバーキュロシス (*Corynebacterium pseudotuberculosis*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacteri-*

um glutamicum)、コリネバクテリウム・レナール (*Corynebacterium renale*)、マイコバクテリウム・フラベッセンス (*Mycobacterium flavescens*)、マイコバクテリウム・アブセッサス (*Mycobacterium abscessus*)、マイコバクテリウム・アイチエンス (*Mycobacterium aichiense*)、マイコバクテリウム・アビウム (*Mycobacterium avium*)、マイコバクテリウム・ボビス (*Mycobacterium bovis*)、マイコバクテリウム・セラタム (*Mycobacterium celatum*)、マイコバクテリウム・チェロネ (*Mycobacterium chelonae*)、マイコバクテリウム・イントラセルラー (*Mycobacterium intracellulare*)、

【0019】マイコバクテリウム・レプレ (*Mycobacterium leprae*)、マイコバクテリウム・チューバーキュロシス (*Mycobacterium tuberculosis*)、マイコバクテリウム・スクロフラセウム (*Mycobacterium scrofulaceum*)、マイコバクテリウム・フォルチタム (*Mycobacterium fortitum*)、マイコバクテリウム・ツルガイ (*Mycobacterium szulgai*)、マイコバクテリウム・ゴルドネ (*Mycobacterium gordonae*)、マイコバクテリウム・シミエ (*Mycobacterium simiae*)、及びマイコバクテリウム・ノンクロマゲニカム (*Mycobacterium nonchromogenicum*)。

【0020】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、レジオネラ (*Legionella*) 属、及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号5に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号5に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0021】配列番号5に示す配列を含むプローブは、レジオネラ属の細菌の16SrRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することで、レジオネラ属の細菌の全菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：レジオネラ・アニサ (*Legionella anisa*)、レジオネラ・ブルネンシス (*Legionella brunensis*)、レジオネラ・チェリイ (*Legionella cherrii*)、レジオネラ・エリスラ (*Legionella erythra*)、レジオネラ・フェーレイ (*Legionella feeleii*)、レジオネラ・ハケリエ (*Legionella hackeliae*)、レジオネラ・ジャメスタウニエンシス (*Legionella jamestowniensis*)、レジオネラ・ジョーダニス (*Legionella jordanis*)、レジオネラ・ロングビーチ (*Legionella longbeachae*)、レジオネラ・オークリジェンシス (*Legionella oakridgensis*)、レジオネラ・パリジエンシス (*Legionella parisiensis*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、

【0022】レジオネラ・ルブリルセンシス (*Legionella*

rubrilucens)、レジオネラ・セインセレンシ (*Legionella sainthelensi*)、レジオネラ・サンチクルシス (*Legionella santicrucis*)、レジオネラ・スピリテンシス (*Legionella spiritensis*)、レジオネラ・ステイガワルチ (*Legionella steigerwaltii*)、及びレジオネラ・ワズワーチ (*Legionella wadsworthii*)。

【0023】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、敗血症の原因菌である、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属、及びクレブシエラ (*Klebsiella*) 属の細菌、及び大腸菌 (*Escherichia coli*)、並びにその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号6に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号6に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0024】配列番号6に示す配列を含むプローブは、敗血症の原因菌である、シュードモナス属細菌および大腸菌、スタフィロコッカス属細菌、クレブシエラ属細菌の16SrRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することで、敗血症の原因菌の各菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：シュードモナス・アエルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、エシエリキア・コリ (*Escherichia coli*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、及びスタフィロコッカス・エピダーミディス (*Staphylococcus epidermidis*)。

【0025】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、アセトバクター (*Acetobacter*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、ブラデヒドビウム (*Bradyrhizobium*) 属、カウロバクター (*Caulobacter*) 属、グルコノバクター (*Gluconobacter*) 属、パラコッカス (*Paracoccus*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属などの紅色非硫黄細菌 (*Proteobacteria*) の α グループに属する細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号7に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号7に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0026】配列番号7に示す配列を含むプローブは、紅色非硫黄細菌の α グループに属する細菌の16SrRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づ

き設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することで、紅色非硫黄細菌の α グループの全菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：アセトバクター・パスツールリアナス (*Acetobacter pasteurianus*)、アセトバクター・ハンセニイ (*Acetobacter hansenii*)、アグロバクテリウム・ルビ (*Agrobacterium rubi*)、アグロバクテリウム・チュームファシエンシス (*Agrobacterium tumefaciens*)、アクアスピリラム・イテルソニ (*Aquaspirillum itersonii*)、ブラデヒドビウム・エスピー (*Bradyrhizobium sp.*)、カウロバクター・エスピー (*Caulobacter sp.*)、グルコノバクター・アサイ (*Gluconobacter asaii*)、及びパラコッカス・デニトリフィカンス (*Paracoccus denitrificans*)、及びリゾビウム・エスピー (*Rhizobium sp.*)。

【0027】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、アルカリジーン (*Alcaligenes*) 属、ボルデトラ (*Bordetella*) 属、スファエロティルス (*Sphaerotilus*) 属、スピリラム (*Spirillum*) 属などの紅色非硫黄細菌 (*Proteobacteria*) の β グループに属する細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号8に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号8に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0028】配列番号8に示す配列を含むプローブは、紅色非硫黄細菌の β グループに属する細菌の16SrRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することで、紅色非硫黄細菌の β グループの各菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：アルカリジーン・デニトリフィカンス (*Alcaligenes denitrificans*)、アルカリジーン・ファエカリス (*Alcaligenes faecalis*)、アルカリジーン・エスピー (*Alcaligenes sp.*)、ボルデトラ・アビウム (*Bordetella avium*)、ボルデトラ・ブロンキセプティカ (*Bordetella bronchiseptica*)、ボルデトラ・パラペルタシス (*Bordetella parapertussis*)、スピリラム・ボルタンス (*Spirillum volutans*)、スファエロティルス・ナタンス (*Sphaerotilus natans*)、ステレラ・ワズワーセンシス (*Sutterella wadsworthensis*)、及びタイロレラ・エクイジェニタリス (*Taylorella equigenitalis*)。

【0029】本願発明に係るプローブとしては、(株)PEバイオシステムズジャパンで合成可能なTaqManプローブが好ましい。TaqManプローブには、5'側にレポーター色素と3'側にクエンチャー色素が付いている。ハイブリダイズしていない状態では、レポ

ーター色素により吸収した光のエネルギーはクエンチャー色素により蛍光として放出される。上記プローブがDNAにハイブリダイズした状態でPCRが進むと、DNAポリメラーゼの持つエキソヌクレアーゼ活性によりプローブが分解し、レポーター色素からクエンチャー色素へエネルギーが伝わらなくなり、レポーター色素が蛍光を発するようになる。このようにハイブリダイゼーションにより、蛍光波長が変化するため、変化した蛍光波長をモニタリングすることで、上記プローブとハイブリダイズするDNA、さらには上記DNAを含む菌の定量が可能になる。

【0030】また、本願発明に係るプローブとしては、配列番号1～8に示す配列をもつオリゴヌクレオチドが望ましいが、その配列の一部を欠いたり、又は配列の上流側又は下流側にヌクレオチドをいくつか追加したプローブであることができる。プローブの熱変性温度（以下、 T_m 値と略す）は特に規定するものではないが、通常プライマーの T_m よりも約4℃以上高くする必要がある。好ましくは、プライマーの T_m よりも約4℃から約10℃高い T_m 値をもつプローブを使用することができる。また、 $TaqMan$ プローブを作製する際は、プローブの5'末端をG以外のヌクレオチドにする必要がある。さらに、プローブ中のCの割合がGの割合よりも高くすることが望ましい。さらにまた、プローブの長さは30mer以下であることが望ましい。

【0031】本プローブを用いて菌を検出・定量する際に設計するプライマーは、センス側を1番目から104番目（大腸菌16SrRNA配列のナンバリング）の間、好ましくは69番目から104番目の間で、アンチセンス側を128番目から250番目の間、好ましくは162番目から226番目の間で設計されることができる。上述のように、プライマーの T_m 値は、プローブの T_m 値よりも約4℃以上低くすること、好ましくは約4℃から約10℃低い T_m 値にすることが好ましい。また、高次構造を形成しないようにプライマーを設計すること、また、プライマーダイマーの形成を防止するために、プライマーの3'末端同士が相補的な配列にならないようにすることが好ましい。

【0032】

【実施例】以下の実施例において本願発明をさらに詳しく説明するが、本願発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【0033】実施例1

乾燥重量1kgのドッグフードに500gのおが屑と50gの牛糞堆肥を混ぜ、含水率が60%になるように水を補給した。その試料を有機性廃棄物分解装置内に投入し1.2L/min・DMの条件で通気してドッグフードを分解処理した。処理容器の壁温が試料温度よりも常に1℃低くなるように温度制御し、分解により生じた発酵熱を利用するようにした。ドッグフードの分解処理過

程でCO₂の発生速度に3つのピークがあった。1つ目のピークは13時間後、2つ目のピークは17時間後、3つ目のピークは24時間後であった。そこで、各ピーク時にサンプリングし、各サンプルの菌叢について、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（以下DGGGEと略す）により解析した。この結果、以下の菌群が優先的に働いていることが分かった：バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・サーモデニトリフィカンス (*Bacillus thermodenitrificans*)、バチルス (*Bacillus*) A10株、バチルス (*Bacillus*) A14株、及びバチルス (*Bacillus*) S1株。バチルス (*Bacillus*) A10株は、バチルス・サーモデニトリフィカンス (*Bacillus thermodenitrificans*) やバチルス・カルドキシルオリティキュ (*Bacillus caldoolylolyticu*) に近縁な種、バチルス (*Bacillus*) A14株は、バチルス・ハロジュランス (*Bacillus halodurans*) やバチルス・サーモクロアカエ (*Bacillus thermocloacae*) に近縁な種、バチルス (*Bacillus*) S1株は、バチルス・サーモスファエリカス (*Bacillus thermosphaericus*) に近縁な種と考えられた。

【0034】上記菌の各々の16SrRNA配列のV1-V2領域を解析したところ、配列番号1に示すものと同じ配列を共通に有していた。そこで、配列番号1の上流側及び下流側における変動領域の配列に基づき、各菌のプライマーセットを以下のように設計した。

バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) (増幅鎖長；85bp (配列番号21))

5'-AGCGGACAGATGGGAGCTT-3' (配列番号9)

5'-TTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTT-3' (配列番号10)

バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) (増幅鎖長；69bp (配列番号22))

【0035】5'-CTTGCTCCCTTAGGTGAGCG-3' (配列番号11)

5'-TTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTT-3' (配列番号12)

バチルスサーモデニトリフィカンス (*Bacillus thermodenitrificans*) (増幅鎖長；63bp (配列番号23))

5'-AGCTTGCTCTTGTGTTGGTCA-3' (配列番号13)

5'-CTTGCGGGCAGGTTGC-3' (配列番号14)

【0036】バチルス (*Bacillus*) A10株 (増幅鎖長；65bp (配列番号24))

5'-CTTGCTTCTGTTGCGTTAGCG-3' (配列番号15)

5'-CCGGTCTTACGGGCAGG-3' (配列番号16)

バチルス (*Bacillus*) A14株 (増幅鎖長；67bp (配列番号25))

5'-GCTCGCTCTCCTTTTCAGTCAG-3' (配列番号17)

5'-GCGAGTTATCCCGTCTTACAG-3' (配列番号18)

バチルス (*Bacillus*) S1株 (増幅鎖長；147bp (配列番号26))

5'-GCTTGCTTTTATGAGGTTAGC-3' (配列番号19)

5'-GGTAGCAGAACCACCTTTCAACA-3' (配列番号20)

【0037】上記各菌のプライマーセットを用いて、生ゴミ処理サンプルから抽出したゲノムを鋳型としてPCRをおこなった。PCRにおいては、94℃で30秒保持する熱変性工程と、58℃で30秒保持するプライマー結合工程と、72℃で1分間保持する伸長工程からなるサイクルを30回繰り返した。PCR溶液の組成を以下の表1に示す。

【0038】

【表1】

各菌のプライマーセット	0.3 μM × 2
dATP	200 μM
dGTP	200 μM
dCTP	200 μM
dTTP	200 μM
KCl	50mM
Tris-HCl (pH8.3)	10mM
MgCl ₂	2.0mM
Taq DNA ポリメラーゼ	0.025 U / μL
サンプル	1 μL / 50 μL

【0039】PCRにより、各菌由来のDNA断片を得ることができた。バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号21に、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号22に、バチルス・サーモデントリフィカンズ (*Bacillus*

thermodenitrificans) のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号23に、バチルス (*Bacillus*) A10株のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号24に、バチルス (*Bacillus*) A14株のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号25に、バチルス (*Bacillus*) S1株のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号26に示す。得られた各菌由来のDNA断片を標準DNAとし、 1×10^5 コピー数/μL、 2×10^5 コピー数/μL、 5×10^5 コピー数/μL、及び 1×10^6 コピー数/μLとなるように、各DNA断片を希釈調製した。

【0040】配列番号1に示す配列のTaqManオリゴヌクレオチドプローブ (5' 末端にFamレポータを、3' 末端にTamarackエンチャーを修飾したもの) を作製した。プライマーを各900 μM、そしてTaqManプローブを200 μM含む、2倍希釈したTaqMan Universal PCR Master Mix (PEバイオシステムズジャパン製) を用いて、各菌について定量的PCRをおこなった。定量的PCRにおいては、95℃15秒の熱変性と60℃1分のプライマー結合・伸長反応を40サイクル行なった。検出・測定器として、GeneAmp 5700 (PEバイオシステムズジャパン製) を用いた。

【0041】解析した各菌の16SrRNA配列の断片数を7で割ることで、各試料中の各菌の数を求めた。各試料における各菌の定量データを以下の表2に示す。表2に示した菌数は、サンプル100mg中における値である。

【表2】

配列番号1に示すオリゴヌクレオチドを含むプローブを用いた

定量的PCRによる各種バチルス属菌の検出・定量
(菌数/サンプル100mg)

	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus thermodenitrificans</i>	<i>Bacillus</i> A10株	<i>Bacillus</i> A14株	<i>Bacillus</i> S1株
サンプル1 (13hr)	4.02×10^4	7.70×10^4	1.28×10^4	3.98×10^4	8.66×10^4	1.75×10^4
サンプル2 (17hr)	1.08×10^4	5.19×10^4	1.24×10^4	2.89×10^4	4.07×10^4	3.52×10^4
サンプル3 (24hr)	1.70×10^4	8.48×10^4	1.92×10^4	7.27×10^4	3.68×10^4	1.19×10^4

【0042】このように、配列番号1に示す配列のTaqManプローブを用いることで、生ゴミ処理過程において働くバチルス属の各菌種を迅速に検出・定量することが可能となった。

【0043】実施例2

デンブンを主成分とする有機性廃棄物1kgに500gのおが屑と50gの牛糞堆肥を混ぜ、含水率が60%になるように水を補給した。その試料を有機性廃棄物分解装置内に投入し、1.2 L/min・DMの条件で通気して分解処理した。試料温度は50℃に保った。分解処理開

始後、24時間目、72時間目、及び96時間目の3点でサンプリングをおこない、各試料の菌叢について、変剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) により解析した。この結果、紅色非硫黄細菌のβグループに属する以下の細菌が働いていることが分かった。アルカリジーン (*Alcaligenes*) S6株、ボルデトラ (*Bordetella*) S9株。

【0044】上記菌の各々の16SrRNA配列のV1-V2領域を解析したところ、配列番号8に示すものと同じ配列を共通に有していた。そこで、配列番号8の上

流側及び下流側における変動領域の配列に基づき、各菌のプライマーセットを以下のように設計した。

アルカリジーン (*Alcaligenes*) S6株 (増幅鎖長; 142bp (配列番号27))

5'-AGCGCGAGGTAAGCTTGCT-3' (配列番号29)

5'-TGCGATCCCCCCTTT-3' (配列番号30)

Bordetella S9株 (増幅鎖長; 135bp (配列番号28))

5'-TTCGGCCTGGCGGC-3' (配列番号31)

5'-AGAGGTCCGAAGGATCCC-3' (配列番号32)

【0045】上記各菌のプライマーセットを用いて、生ゴミ処理サンプルから抽出したゲノムを鋳型としてPCRをおこなった。PCRにおいては、94℃で30秒保持する熱変性工程と、58℃で30秒保持するプライマー結合工程と、72℃で1分間保持する伸長工程からなるサイクルを30回繰り返した。PCR溶液の組成は表1に示したものと同一であった。

【0046】PCRにより、各菌由来のDNA断片を得ることができた。アルカリジーン (*Alcaligenes*) S6株のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号27に、ボルデトラ (*Bordetella*) S9株のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号28に示

す。得られた各菌由来のDNA断片を標準DNAとし、 1×10^5 コピー数/ μL 、 2×10^5 コピー数/ μL 、 5×10^5 コピー数/ μL 、及び 1×10^6 コピー数/ μL となるように、各DNA断片を希釈調製した。

【0047】配列番号8に示す配列のTaqManオリゴヌクレオチドプローブ (5' 末端にFamレポータを、3' 末端にTamarackエンチャーを修飾したもの) を作製した。プライマーを各900 μM 、そしてTaqManプローブを200 μM 含む、2倍希釈したTaqMan Universal PCR Master Mix (PEバイオシステムズジャパン製) を用いて、各菌について定量的PCRをおこなった。定量的PCRにおいては、95℃15秒の熱変性と60℃1分のプライマー結合・伸長反応を40サイクル行なった。検出・測定器には、GeneAmp 5700 (PEバイオシステムズジャパン製) を用いた。

【0048】解析した各菌の16SrRNA配列の断片数を7で割ることで、各試料中の各菌の数を求めた。各試料における各菌の定量データを以下の表3に示す。表3に示した菌数は、サンプル100mg中における値である。

【表3】

配列番号8に示すオリゴヌクレオチドを含むプローブを用いた

定量的PCRによる菌の検出・定量
(菌数/サンプル100mg)

	<i>Alcaligenes</i> S6株	<i>Bordetella</i> S9株
サンプル1 (24hr)	3.52×10^4	8.04×10^4
サンプル2 (72hr)	1.80×10^4	2.24×10^4
サンプル3 (96hr)	1.73×10^4	2.05×10^4

【0049】このように、配列番号8に示す配列のTaqManプローブを用いることで、有機性廃棄物処理過程において働く紅色非硫黄細菌の β グループに属する各菌種を迅速に検出・定量することが可能となった。

【0050】

【発明の効果】本願発明は、大腸菌の16SrRNAをコードするDNAのセンス側から数えて、104番目から126番目の配列 (5'-GGCGGACGGGTGAGTAATGTCTG-3') に相当する真正細菌の16SrRNAをコードするDNA配列又はその相補的配列を含むオリゴヌクレオチドに蛍光色素を付加したプローブと、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーとを用いてPCRを行ない、そして変化した

プローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することにより、各種真正細菌群の中の特異的な種のみを検出・定量する方法を提供するものである。本願発明のプローブを用いることにより、真正細菌における全ての菌種を迅速に検出・定量することが可能となる。また、本願発明に係る検出・定量方法においては、真正細菌間で非特異的なプローブを用いることにより、バチルス属やレジオネラ菌、放線菌、肺血症原因菌、紅色非硫黄細菌の α グループや、紅色非硫黄細菌の β グループなどの検出に際して、共通のプローブを用いることができるため経済的である。

【配列表】

<110> Denso Co., Ltd.

<120> A method for identifying and quantitatively determining eubacteria

<130> ND 1004228

<160> 32

<210> 1

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 1
 cacgtgttac tcacccgtcc gcc 23
 <210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 2
 tacgtgttac tcacccgtcc gcc 23
 <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 3
 caagcattac tcacccgtcc gcc 23
 <210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 4
 cacgtgttac tcacccgttc gcc 23
 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 5
 tacgcgttac tcacccgttc gcc 23
 <210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 6
 asryrttact caccgcgtcc gcc 25
 <210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 7
 acgygttact caccgcgttc gcc 25
 <210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 8
 atrywtact caccgcgttc gcc 25
 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence	
<400> 9	
agcggacaga tgggagctt	19
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 10	
ttatcccagt cttacaggca gggt	24
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 11	
cttgcctcct taggtcagcg	20
<210> 12	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 12	
ttatcccagt cttacaggca gggt	24
<210> 13	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 13	
agcttgcctc tgtttgggtc a	21
<210> 14	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 14	
cttgcgggca ggttgc	16
<210> 15	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 15	
cttgcctctg ttcggttagc g	21
<210> 16	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 16	
ccggtcttac gggcagg	17
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<400> 17	

gctcgtcttc ctttcagtca g 21
 <210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 18
 gcgagttatc ccggtcttac ag 22
 <210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 19
 gcttgctttt tatgaggta gc 22
 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 20
 ggtagcagaa ccacattca aca 23
 <210> 21
 <211> 85
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis
 <400> 21
 agcggacaga tgggagcttg ctccctgatg ttagcggcgg acgggtgagt aacacgtggg 60
 taacctgcct gtaagactgg gataa 85
 <210> 22
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Bacillus licheniformis
 <400> 22
 cttgctccct taggtcagcg gcggacgggt gagtaacacg tgggtaacct gcctgtaaga 60
 ctgggataa 69
 <210> 23
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Bacillus thermodenitrificans
 <400> 23
 agcttgctct tgtttgggtc agcggcggac gggtagtaa cacgtgggca acctgcccgc 60
 aag 63
 <210> 24
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Bacillus A10
 <400> 24
 cttgtctctg ttcggttagc ggccgacggg tgagtaacac gtgggtaacc tgcccgtaaag 60
 accgg 65
 <210> 25
 <211> 77
 <212> DNA

<213> Bacillus A14

<400> 25

gctcgtctc ctttcagtca gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcctgta 60
agaccgg 67

<210> 26

<211> 147

<212> DNA

<213> Bacillus S1

<400> 26

gcttgctttt tatgaggta gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgccctat 60
agaccgggat aactcgcgga aacgcgtgct aataccggat aacacagcgg agcgcgtgct 120
ccggtgttga aagtggttc tgctacc 147

<210> 27

<211> 142

<212> DNA

<213> Alcaligenes S6

<400> 27

agcgcgaggt aagcttgctt accttggcgg cgagtggcga acgggtgagt aatgtatcgg 60
aacgtgcccc gtagcggggg ataactactc gaaagagtgg ctaataccgc ataccgccca 120
cgggggaaag ggggggatcg ca 147

<210> 28

<211> 135

<212> DNA

<213> Bordetella S9

<400> 28

ttcggcctgg cggcgagtgg cgaacgggtg agtaatgcat cggaacgtgc ccagtagtgg 60
gggataacca cgcgaaagcg tggctaatac cgcatacgcc cttaggggga aaggggggga 120
tccttcggga cctct 135

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 29

agcgcgaggt aagcttgct 19

<210> 30

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 30

tgcgatcccc cctttt 16

<210> 31

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 31

ttcggcctgg cggc 14

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 32

agaggtcccg aaggatccc

19

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
G 0 1 N 33/569		G 0 1 N 33/58	A
33/58		C 1 2 N 15/00	Z N A A

Fターム(参考) 2G045 AA28 AA35 CB21 DA12 DA13
 DA14 FB01 FB02 FB07 FB12
 GC15
 2G054 AA07 AB02 AB05 BB08 CA20
 CA22 CE02 EA03 GA04 GB02
 4B024 AA11 AA13 CA09 HA14
 4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ50 QR08
 QR32 QR42 QR55 QR62 QS25
 QS34 QX02